



TITLE:

Screening of human cDNA library reveals two differentiation-related genes, HHEX and HLX, as promoters of early phase reprogramming toward pluripotency(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Yamakawa, Tatsuya

CITATION:

Yamakawa, Tatsuya. Screening of human cDNA library reveals two differentiation-related genes, HHEX and HLX, as promoters of early phase reprogramming toward pluripotency. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-09-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19967>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-08-01に公開

京都大学	博士（医学）	氏名	山川達也
論文題目	Screening of human cDNA library reveals two differentiation-related genes, <i>HHEX</i> and <i>HLX</i> , as promoters of early phase reprogramming toward pluripotency（ヒト cDNA ライブラリーのスクリーニングにより発見された 2 つの分化関連因子（HHEX と HLX）はヒト多能性幹細胞の誘導における初期フェーズを促進する）		
（論文内容の要旨）			
<p>体細胞に複数の遺伝子を強制的に発現させることで細胞を初期化し、ES 細胞と同様の多分化能と増殖能を持つ人工多能性幹（iPS）細胞を作製できる。その発見以降、多くの研究者らにより新たな初期化遺伝子が同定されて来た。しかし、それらの研究で検討されたのは、主に ES 細胞や初期胚で高く発現する遺伝子に限定されており、またヒト体細胞を用いた広範囲なスクリーニングは行われていなかった。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞作製に影響を与える因子を広く同定するために、ES 細胞特異的な遺伝子に限らず、転写因子を中心とする 2,008 遺伝子を含むヒト cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。</p> <p>各候補因子の iPS 細胞作製への影響は、基本となる初期化因子（OCT3/4 と SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28）に候補遺伝子の 1 遺伝子を加えた 6 因子をヒト線維芽細胞へ導入し、そこから作製される iPS 細胞コロニーの数の変化で評価した。評価に先立ち、誘導された iPS 細胞コロニーの数を自動的に計測するシステムを Nikon 社の協力のもと作製した。このシステムを用いてスクリーニングを実施し、誘導効率を 2 倍以上に増加させる 51 遺伝子と、1/5 以下に減少させる 65 遺伝子を同定した。GO 解析の結果から、誘導効率を上げる遺伝子群には分化関連因子やホメオボックスを持つ遺伝子が多く含まれている事がわかった。そこで、誘導効率を特に上昇させ、ホメオボックスモチーフを持ち、分化誘導因子として知られる HHEX と HLX を以降の解析に用いた。</p> <p>始めに再現性について、異なるドナー由来の複数の線維芽細胞でも HHEX と HLX が iPS 細胞誘導効率を上昇させることを確認した。特に成人由来の線維芽細胞では HHEX や HLX を用いると 12 倍以上に誘導効率が上昇した。この 2 遺伝子を用いて作製した iPS 細胞はヒト ES 細胞様の形態を持ち、多能性幹細胞特異的な遺伝子の発現を示した。また、マウスへの移植により三胚葉を含むテラトーマを形成したことから多分化能を持っていることが確認できた。</p> <p>次に、2 遺伝子による誘導効率の上昇機序を明らかにするため、iPS 細胞の誘導途中に見られる iPS 細胞前駆細胞（TRA-1-60 陽性細胞）について調べた。その結果、初期化因子導入後 4 日目から 15 日目の誘導初期に TRA-1-60 陽性細胞の割合が増加していた。特に HHEX を用いた場合では、7 日目の TRA-1-60 陽性細胞において対照群と比べて ES 細胞特異的な遺伝子が高く発現し、逆に線維芽細胞特異的な遺伝子は低下していた。さらに、iPS 細胞誘導中の 1-10 日目でのみ HHEX や HLX を発現させる実験からも、両遺伝子が誘導初期に機能して効率を上げている事が確認された。一方で、誘導後期である 20 日、あるいは 30 日まで発現を継続させると逆に誘導効率が低下する事がわかった。この阻害効果を確かめるために、HHEX や HLX を直接ヒト iPS 細胞で強制発現させ、多能性の維持への影響を検討した。その結果、これら遺伝子により幹細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ陽性細胞の減少が認められた。マイクロアレイ解析からは広範な多能性幹細胞特異的な遺伝子の発現減少と、各胚葉の体細胞マーカー遺伝子の発</p>			

現上昇が明らかとなった。これらの結果から、HHEX と HLX は iPS 細胞誘導の初期では促進作用を持つものの、誘導後期や多能性の維持については阻害するという相反する性質を持つ遺伝子であることがわかった。

本研究によりこれまで体細胞の初期化には関与しないと考えられていた多くの遺伝子が誘導効率に影響を与えることが明らかになり、今後の初期化過程の機構解明につながる知見となりうる。

（論文審査の結果の要旨）

現在、iPS 細胞誘導に関与すると知られている遺伝子は、ES 細胞の多能性に関与する遺伝子が大半である。本研究では、分化関連因子を含むヒト cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより、iPS 細胞誘導に影響を与える遺伝子を広く同定した。スクリーニングでは、2,008 遺伝子各々の iPS 細胞誘導への影響を明らかにした。誘導効率を上昇させる遺伝子群には、分化関連因子が多く含まれていることが判明し、この内から HHEX と HLX に着目した。2 遺伝子は複数のヒト線維芽細胞株において iPS 細胞誘導効率を上昇させ、作製された iPS 細胞は ES 細胞と同様の遺伝子発現や多分化能を持っていた。iPS 細胞誘導過程では、2 遺伝子が遺伝子導入後 15 日目までの誘導初期に iPS 細胞前駆細胞の割合を増やすことを見出した。特に HHEX を用いた場合では 7 日目の前駆細胞において対照群と比べて ES 細胞特異的な遺伝子が高く発現していた。一方で、誘導後期に 2 遺伝子を発現させた際は誘導効率が低下した。この阻害効果は、HHEX や HLX をヒト iPS 細胞に強制発現することで分化が誘導されることから裏付けられた。HHEX と HLX は分化誘導因子でありながら体細胞初期化を促進し、初期化過程の前期と後期で相反する機能を持つ遺伝子であることを明らかにした。

以上の研究は、体細胞初期化に関わる因子の解明に貢献し、その機構解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 8 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降